

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620101152422

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

厦门港有害藻基因芯片快速检测技术研究

Research on Rapid Detection Technique of Harmful Algae
in Xiamen Bay Using Microarray

钱成穗

指导教师姓名: 张宜辉 副教授

郑森林 副研究员

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2013 年 07 月

论文答辩时间: 2013 年 09 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(赤潮监测预报与防灾减灾子项目二赤潮监测技术、物种鉴定与评估损失等支撑技术)课题(组)的研究成果,获得(国家海洋局海洋三所海洋生态与生物)课题(组)经费或实验室的资助,在(郑森林)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文,并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版),允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索,将学位论文的标题和摘要汇编出版,采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于:

() 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文,于
年 月 日解密,解密后适用上述授权。

() 2.不保密,适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文,未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的,默认为公开学位论文,均适用上述授权。)

声明人(签名):

年 月 日

目 录

摘 要.....	V
Abstract.....	VII
第一章 前言	1
1.1 有害藻华.....	1
1.1.1 有害藻华定义.....	1
1.1.2 有害藻华的危害.....	2
1.2 有害藻华国内外发展趋势.....	3
1.2.1 有害藻华扩张.....	3
1.2.2 厦门港与九龙江口有害藻华概况.....	5
1.3 有害藻检测方法概况.....	6
1.3.1 基于显微镜方法.....	6
1.3.2 分子生物学方法.....	7
1.4 本研究目的、内容和意义.....	11
1.5 本研究技术路线与创新点.....	12
第二章 材料和方法	13
2.1 研究区域概况.....	13
2.2 样品采集与处理.....	14
2.3 环境样品有害藻镜检.....	14
2.4 环境因子测定.....	15
2.5 实时定量 PCR.....	15
2.5.1 藻种.....	15
2.5.2 主要试剂与溶液.....	16
2.5.3 主要仪器和工具.....	17
2.5.4 DNA 提取.....	18
2.5.5 标准藻标准曲线的建立.....	19
2.6 基因芯片.....	20
2.6.1 RNA 提取与纯化.....	20
2.6.2 RNA 标记和片段化.....	21
2.6.3 对照准备.....	22
2.6.4 芯片制备.....	22
2.6.5 芯片杂交.....	28
2.6.5.1 封闭.....	28
2.6.5.2 杂交.....	28
2.6.5.3 洗脱.....	29
2.6.5.4 芯片扫描.....	29
2.6.6 数据分析.....	29
第三章 实验结果与讨论	30

3.1 环境参数周年变化.....	30
3.2 厦门港样品镜检检出的浮游植物物种组成.....	32
3.3 基因芯片探针信号值与传统镜检，qPCR 计数关系	38
3.3.1 拟菱形藻属.....	40
3.3.2 亚历山大属和链状裸甲藻.....	42
3.3.3 鳍藻属和原甲藻属.....	44
3.3.4 凯伦藻属.....	47
3.3.5 赤潮异弯藻.....	49
3.3.6 镜检未观察到但芯片检测到物种.....	50
3.4 厦门海域典型站位重要产毒藻的周年变化.....	52
第四章 结论与展望	55
4.1 寡核苷酸芯片可适用于厦门港海域有毒藻半定量和定性检测	55
4.2 芯片高通量检测应用面对问题.....	56
4.3 展望.....	56
参 考 文 献	57
致谢.....	68

Contents

Contents	III
Abstract in chinese	V
Abstract in English.....	VII
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Harmful aglal Bloom	1
1.1.1 The defination of HABs	1
1.1.2 The Hazard of HABs.....	2
1.2 The trend of HABs	3
1.2.1 The spread of HABs	3
1.2.2 The HABs of Xiamen Bay and Jiulong River Estuary	5
1.3 Methods for Enviroment Harmful Algal Study	6
1.3.1 Based on Microscopy Method.....	6
1.3.2 Based on Molecular Method	7
1.3.2.1 Real-time PCR	8
1.3.2.2 Fluorescence in situ Hybridization	8
1.3.2.3 Microarray.....	9
1.3.2.4 Sandwich hybridization assay	9
1.3.2.5 Biosensor.....	10
1.3.2.6 Other methods	10
1.4 The purpose and content of this study.....	11
1.5 The technical route of this study and innovation points.....	12
Chapter 2 Materials and Methods	13
2.1 Research Area	13
2.2 Field Sampling	14
2.3 Cell Counts.....	14
2.4 Determination of enviromental factors	15
2.5 Real-time PCR	15
2.5.1 Algae culture	15
2.5.2 Reagent and Solution	16
2.5.3 Main instruction	17
2.5.4 DNA Extraction.....	18
2.5.5 Standard curve of <i>Karenia mikimotoi</i>	19
2.6 Microarry	20
2.6.1 RNA Extraction and Clean.....	20
2.6.2 RNA labling and Fragement.....	21
2.6.3 Control preparion	22
2.6.4 Microarray design and preparion	22
2.6.5 Microarray Hybridization.....	28
2.6.5.1 Blocking	28
2.6.5.2 Hybridization.....	28

2.6.5.3 Washing	29
2.6.5.4 Scan the Microarray	29
2.6.6 Date Analysis	29
Chapter3 Result and Discussion	31
3.1 Annual change of enviroment factors.....	31
3.2 Species composition during Samping period based on cell counts	33
3.3 Relation between Microarray signals,cell counts and Real-time PCR.....	39
3.3.1 <i>Pseudo-nitzschia</i>	41
3.3.2 <i>Alexandrium</i> and <i>Gymnodinium catanetum</i>	43
3.3.3 <i>Dinophysis</i> and <i>Prorocentrum</i>	45
3.3.4 <i>Karenia</i>	48
3.3.5 <i>Hetersigma akashiwo</i>	50
3.3.6 Species unfound by Cell counts but idenified with Microarray and Hierarchy File	51
3.4 Annual occurrence of the genus or species toxic aglae examined by microarrays Sampled from Xiamen bay	53
Chapter 4 Conclusion and Prospection	56
4.1 Oligonucleotide Microarray is suitable for semi-quantitative and qualitative detection of the toxic algae in Xiamen Bay	56
4.2 The problem that high-through microarray detection confront	57
4.3 Prospection.....	57
Reference	58
Acknowledgment.....	69

摘要

近 30 年来,有害藻华发生次数、强度、分布地域都不断增加,这引发了公众健康问题并造成巨大经济损失。监测有害藻的动态变化对预测有害藻华爆发及其对人类与生态系统的风险有着重要意义。然而基于形态学的传统镜检方法耗时耗力,且很难区分一些形态极其相近的物种和毒素分布。因而采取分子生物学方法作为互补手段,以确保快速和可靠的物种鉴定。欧盟第七框架计划资助的 MIDTAL (有毒藻类检测芯片) 微阵列以 rRNA 基因 (SSU 和 LSU) 作为目标基因鉴定有毒藻。

本研究利用 MIDTAL 项目已验证特异性探针,结合厦门海域有害浮游植物种属特点,设计了适用于厦门海域有毒藻检测的寡核苷酸芯片。在厦门西港、九龙江口、厦门外港共设置 3 个站位,从 2012 年 5 月至 2013 年 4 月 1 周年共采集 66 个样品,对样品进行传统镜检,实时定量 PCR,基因芯片 3 种方法检测与比较分析。

主要结果如下:

1) 本研究共镜检出浮游植物 106 种,其中有害藻 60 种,11 种具有潜在产毒素的能力。硅藻检出 25 属 61 种,占总种数的 57.4%;甲藻 9 属 27 种,占总种数的 25.47%;绿藻 6 属 10 种,占总种数的 9.43%;蓝藻 5 属 6 种,占 5.66%;着色鞭毛藻门 2 属 2 种 1.80%。圆筛藻属、角毛藻属、骨条藻属为厦门港的常年优势类群,其细胞数影响着整个群落的细胞数量,在一定程度上左右了该海区浮游植物的时空分布。

2) 通过传统镜检计数与实时定量 PCR 定量结果比较验证芯片探针信号,芯片不仅能有效检测出厦门港主要 6 大类群的有毒藻 (*Dinophysis*, *Karenia*, *Alexandrium*, *Prorocentrum*, *Pseudonitzschia*, *Heterosigma akashiwo*), 而且检出了镜检未检出的类群 (*Pseudochattonella*, *Prymnesiophyta*, *Karlodinium veneficum*)。芯片共检测到 21 个种/亚种潜在产毒藻,而传统镜检仅检出 11 种,这意味着芯片对低细胞密度藻的检测更为灵敏。

3) 用镜检数据对鳍藻属探针 DphyGS03_25_dT, *Alexandrium* 属探针 AlexGD01_25_dT 的芯片信号进行校准,相关校准曲线分别为 $y=45.441x-0.6298$, $R^2=0.9477$; $y=0.0013x-0.2453$, $R^2=0.5380$ (x 为探针信号值, y 为细胞数)。利用

实时定量 PCR 结果校准米氏凯伦藻的种探针 KmikiD01_25_dT 的芯片检测信号，获得校准曲线 $y = 94.562x - 6.0238$ ， $R^2 = 0.9948$ ，结果表明芯片可用于有害藻的半定量分析。

4) 应用校准曲线将相应探针信号换算成细胞密度，获得 *Dinophysis*，*Alexandrium*，*Karenia mikimotoi* 周年变化曲线，细胞浓度在 2-3 月份与 6-7 月份达到高峰，而 9 月份开始到来年 1 月份基本没有检出。说明春季与夏季早期均为有害藻潜在爆发期，尤其是亚历山大藻。

综上所述，本研究设计的寡核苷酸芯片可适用于厦门海域有毒藻动态高通量快速检测分析。

关键词：寡核苷酸芯片；镜检；qPCR；有毒藻；厦门港

Abstract

Over the last three decades, the frequency, density and geographical distribution of harmful algal blooms (HABs) are increasing, which raises public health concerns and cause huge economic loss. Monitoring the dynamic change of harmful algae has important contribution for the prediction of HABs phenomena and the identification of risks related to toxic algal species to human and ecological system. However, the effectiveness of monitoring programs using light microscopic identification is limited by the fact that it is time consuming and that morphology, as determined by light microscopy, may be insufficient to give definitive species. Thus, there is a need to implement molecular methods to ensure a fast and reliable species identification. The project MIDTAL (Microarray Detection of Toxic Algae)—an FP7-funded EU project—used rRNA genes (SSU and LSU) as a target on microarrays to identify toxic species.

In this study, according to the characteristics of Xiamen bay harmful phytoplankton species, we designed oligonucleotide microarrays for toxic algae identification using the molecular probes verified by the project MIDTAL. We set three sampling sites located in the inner and outer area of Xiamen Bay, and Jiulong River estuary respectively. All together 66 samples were collected during the period from May 2012 to April 2013 from these sampling sites. The microarray was applied to field samples from above three sampling sites and compared to microscopic cell counts and qPCR.

The main results are showed as following.

1) According to microscopic counts, 106 microalgae species were identified, including 60 harmful species, and 11 of them are potential toxin producers. Bacillariophyta occupied 57.40% of all the algae species, including 56 species in 25 genera; Pyrohophyta occupied 25.47%, including 27 species in 9 genera. Chromophyta occupied 9.43%, including 10 species in 6 genera. Cyanophyta occupied 5.66%, including 6 species in 5 genera. Heterokonts occupied 1.8%, including 2 species in 2 genera; Dominant taxa in the 66 samples were *Chaetoceros*

spp., *Skeletonema* spp. and *Coscinodiscus* spp., which can determined the distribution of phytoplankton community in time and space.

2) Relations between microarray signal and cell counts by microscopic and qPCR indicates that the microarray not only effectively detected 6 genera of toxic algae (*Dinophysis*, *Karenia*, *Alexandrium*, *Prorocentrum*, *Pseudonitzschia* and *Heterosigma*) which were observed by microscopic accounts, but also 3 genera (*Pseudochattonella*, *Prymnesiophyta*, *Karlodinium veneficum*) not observed by microscopy. In this study, 21 toxic algae were detected by microarray, while only 11 by microscopy. it is likely that the volume difference between the species filtered and settled for counting reflects the potential of the microarray to be more sensitive for the detection of low cell concentration algae.

3) The microarray signals of *Dinophysis* genus-level probe DphyGS03_25_dT and *Alexandrium* genus-level probe AlexGD01_25_dT were calibrated using cell counts and their calibration curve were listed as following respectively. $y=45.441x-0.6298, R^2=0.9477$ (x is signal value, y is cell number, the same as below) ; $y=0.0013x-0.2453, R^2=0.5380$. Microarray signals of *Karenia mikimotoi* species-level probe KmikiD01_25_dT were calibrated by qPCR results, the calibration curve is as follow: $y = 94.562x - 6.0238, R^2 = 0.9948$. These results suggest this microarray approach was useful for the semiquantitative detection.

4) The annual dynamic densities of the toxic algae of *Dinophysis*, *Alexandrium*, *Karenia mikimotoi* suggested that the peak values appeared in February to March and June to July, but none detection in the period from September to January. The result indicates that in Xiamen Bay, early spring and early summer are the periods of potentially risk of toxic algae bloom, especially for *Alexandrium*.

In summary, the microarray designed in this study has great potential to be used as a high-throughput monitoring tool for toxic algae in Xiamen Bay.

Key words: Microarray; qPCR; Microscopy assay; Toxic algae; Xiamen Bay

第一章 前言

1.1 有害藻华

1.1.1 有害藻华定义

浮游生物 (Plankton) 是指一类生活在水中, 没有或仅有微弱的游泳能力, 只能随水流、波浪等被动漂游的生物类群, 包括浮游植物 (Phytoplankton) 和浮游动物 (Zooplankton) (郑重 1984)。浮游植物指浮游生物中一类自身具有色素或色素体, 能进行光合作用并制造有机物的自养型单细胞浮游生物 (autotrophic plankton) (郑重 1984; Thurman & Burton 1997), 其作为海洋生态系统的重要组成部分, 负责全球(陆地和海洋) 大约一半的净初级生产力 (Tréguer 1995; Field *et al.*, 1998)。目前报道大约有 5000 种海洋浮游植物物种 (Sournia 1995; Nathalie *et al.*, 2009), 大约 80 种会产生毒素, 通过鱼和贝类引起人类毒害 (Zigone and Enevoldsen 2000; Landsberg 2002; Hallegraeff 2003; Maso and Garcés 2006)。

在一定环境条件下, 浮游植物通过高增长率并达到高细胞密度, 这种时间被称为藻华 (Algae Bloom)。通常可以分为两种, 一种为, 温带春天硅藻响应不断增加的光照、温度和水体丰富的营养, 可引起暴发生长, 所引起的春季藻华, 为这些地区浮游植物的周期事件。而一些藻华对公共健康, 水产养殖业乃至对海洋系统有负面影响, 被称为“有害藻华” (Harmful Algal Blooms, HABs)。有害藻华之前国内普遍称为赤潮 (Red tide), 又称红潮, 是指海洋中一些浮游生物在一定环境条件下爆发性增殖或聚集引起海水变色的现象, 包括所有能改变海水颜色的有毒藻或无毒藻引发的赤潮, 以及那些虽然生物量低又不能改变海水颜色, 但却含有藻毒素而具有危险性的藻华 (邹景忠 2004)。有害藻华这一术语, 可定义为因微藻或细菌的爆发性增殖或产生的毒素而导致水生动物大量死亡、水产品污染, 并改变生态系统的结构和功能, 危害人类健康的生态异常现象 (Backer & McGillicuddy 2006)。目前的定义强调藻华危害性, 藻的浓度与它们潜在的有害效应并没有明确线性的关系, 比如产毒的 *Dinophysis* (Mariño *et al.* 1993; Blanco *et al.* 1998), *Alexandrium* 和 *Pyrodinium* (Hallegraeff 2003) 即使在很低的密度, 也会产生毒素, 在海产品中积累。人类食用这些海鲜会导致疾病甚至死亡, 或者

可以导致贝类和鱼类疾病或者死亡(Hallegraeff 2003 ; Granéli and Turner 2007)。

有害藻华可根据其有无毒性,可以分为三大类 (Hallegraeff 2003 ; 齐雨藻等, 2003), 第一类无毒藻华, 它们一般无害, 但会导致海水变色, 当达到很高密度时, 细胞死亡分解造成海水缺氧, 无差别杀死海洋生物。第二类可以产生毒素, 通过食物链造成人类肠胃消化系统或者神经系统中毒。第三类对人无害但对水生动物有害, 藻华不会威胁人类健康, 但对鱼类和无脊椎动物的生命活动有较大影响(尤其是高密度的养殖区)。这类藻并不产生毒素, 而是通过藻体自身特殊结构, 给鱼类及其他无脊椎动物鳃造成物理损伤, 或者通过产生具有溶血活性或细胞毒性的物质损伤鱼腮组织(Hallegraeff 2003, Núñez *et al.* 2011)。新近发现从 *Karenia mikimotoi* 中提取的毒性物质对哺乳动物细胞生长发育有不良作用 (Yang *et al.* 2011), 这也暗示着人类大量食用可能也会带来危害。

1.1.2 有害藻华的危害

过去30年来, 有害藻华事件发生次数、强度、地域分布都不断增加, 对公众和动物的健康, 一些生产性活动, 比如水产养殖、渔业、旅游业造成很大的影响 (Hallegraeff *et al.*, 2003, 齐雨藻等, 2003, Núñez *et al.* 2011)。有害赤潮的危害效应可以分成四类: 对人类健康的影响; 对野生的和养殖的经济海洋生物的影响; 对海洋生态系统的影响; 对海洋旅游和娱乐功能的影响等(Zigone and Enevoldsen 2000, Landsberg 2002)。

(1) 对人类的危害

滤食性贝类以及草食性动物等摄食有毒藻, 毒素在贝类中富集积累, 人类食用这些贝类就会带来伤害, 甚至致命。在全世界范围内, 每年大概有2000人中毒, 大概有15%致死率(Hallegraeff *et al.* 2003), 有毒藻华发生后, 赤潮生物和鱼虾贝类等海洋生物死亡过程中分解产生有毒气溶胶颗粒, 常引起人的呼吸道疾病, 或者皮肤接触引起感染(齐雨藻等, 2003; Maso and Garces 2006)。

(2) 对野生的和养殖的经济海洋生物的影响

有害藻华通过低氧水平, 直接毒性, 溶血和机械损失等不同机制导致野生和养殖经济海洋生物的大量死亡。1989年, 河北沿海有害藻华引起15000公顷的虾池的影响, 导致损失价值4000万美元(Wang *et al.*, 1998)。更有甚者一些有毒藻分

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博